



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 35/78, A61P 17/06, 17/10, 17/12, 17/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/16791 (43) Date de publication internationale: 30 mars 2000 (30.03.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02189 (22) Date de dépôt international: 15 septembre 1999 (15.09.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/11619 17 septembre 1998 (17.09.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PUYBARET, Christel [FR/FR]; 17, rue du Val d'Aran, F-31240 L'Union (FR). DAVID, Bruno [FR/FR]; 44, rue de la Viguerie, F-31650 Saint-Orens de Gameville (FR). CHARVERON, Marie [FR/FR]; 25, rue de Metz, F-31000 Toulouse (FR). MAMATAS, Stylianos [GR/FR]; Résidence les Cyclades, Bâtiment B, 25, boulevard de la Méditerranée, F-31400 Toulouse (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: MYRTLE EXTRACT, PREPARATION METHOD AND USE (54) Titre: EXTRAIT DE MYRTE, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATION (57) Abstract <p>The invention concerns an extract of the aerial parts of myrtle, a method for preparing said extract and dermatological or cosmetic compositions containing said extract useful for treating psoriatic pathologies. Said original myrtle extract is characterised in that it has anti-inflammatory, antiproliferative and anti-bacterial properties capable of being advantageously used for treating psoriasis, and related disorders. The aerial parts of myrtle are extracted using an appropriate solvent to obtain an extract with no chlorophyll content. The last step enables to obtain an extract enriched in apolar active compounds. The compounds which were formerly considered to be active against psoriasis such as essential oils, tannins are therefore eliminated from said extract. Various galenic forms are presented to illustrate the invention without limiting its scope.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un extrait de parties aériennes de Myrte, un procédé de préparation de cet extrait et les compositions dermatologiques ou cosmétiques le contenant utiles pour traiter les pathologies psoriasiques. Cet extrait original de Myrte possède selon l'invention les propriétés anti-inflammatoires, antiprolifératives et antibactériennes utilisables avantageusement dans le traitement du psoriasis, et des troubles associés. Les parties aériennes du Myrte sont extraites par un solvant approprié pour obtenir un extrait qui sera débarrassé des chlorophylles. La dernière étape permet d'obtenir l'extrait enrichi en composés actifs apolaires. Les composés autrefois supposés actifs vis à vis du psoriasis comme les huiles essentielles, les tanins sont donc éliminés de notre extrait. Diverses formes galéniques illustrent l'invention sans en limiter la portée.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

EXTRAIT DE MYRTE, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATION

5 La présente invention concerne un extrait de parties aériennes de Myrte (*Myrtus communis* L., Myrtaceae) et un procédé de préparation de cet extrait. Cet extrait présente un intérêt dans le traitement des syndromes inflammatoires cutanés et des syndromes de différenciation cutané comme notamment le psoriasis
10 et les troubles de la kératinisation. La présente invention concerne encore une composition dermatologique et/ou cosmétique et l'utilisation de cette composition en particulier pour le traitement du psoriasis. Diverses formes galéniques illustrent l'invention sans en limiter la portée.

15 La présente invention concerne plus particulièrement un extrait de parties aériennes de Myrte, cet extrait est une fraction apolaire qui contient des composés acylphloroglucinols, en outre cet extrait est essentiellement exempt de chlorophylles. Parmi les composés acylphloroglucinols contenus
20 dans cet extrait, on compte des myrtucommulones et en particulier la myrtucommulone-B'. Des triterpènes et des stérols sont également présents. Le titre de myrtucommulone-B' est compris entre 2% et 12 %, de préférence compris entre 4% et 8% et de manière encore plus préférée entre 5% et 7% et le titre en
25 "triterpènes et stérols" est compris entre 30 % et 50 % et de préférence compris entre 37 % et 43 % .

 Au sens de la présente description, le titre est défini comme la masse de la substance considérée (substance titrée) par rapport à la masse du produit final (volume de l'extrait de
30 Myrte).

 La présente invention concerne aussi un procédé de préparation d'un extrait de parties aériennes de Myrte tel qu'il comprend une étape dans laquelle les parties aériennes de Myrte sont soumises à une extraction au moyen d'un solvant, une étape

d'élimination des chlorophylles de préférence effectuée au moyen de charbon actif et une étape dans laquelle les composés apolaires sont isolés, cette étape est par exemple une extraction liquide/liquide, une précipitation en évaporant le solvant organique sur l'eau. Le solvant le plus souvent utilisé pour effectuer l'extraction sur les parties aériennes de la plante est un alcool de préférence choisi dans le groupe formé par l'éthanol, le méthanol, l'isopropanol, ou une cétone de préférence choisie dans le groupe formé par l'acétone, la méthyléthylacétone. On peut cependant aussi employer l'hexane, le chlorure de méthylène, l'éther isopropylique, l'acétate d'éthyle.

L'extrait selon la présente invention peut être obtenu par le procédé selon la présente invention.

La présente invention concerne aussi une composition dermatologique et/ou cosmétique qui comprend un extrait selon la présente invention et l'utilisation de ladite composition pour le traitement du psoriasis, des troubles de la kératinisation de la peau et du cuir chevelu, les parakératoses, la dermatite atopique, les xéroses, les diskératoses, les ichtyoses, l'acné.

Le psoriasis est une maladie difficile à traiter qui affecte environ 2 à 3 % de la population mondiale. Cette affection, sans modifier la durée de vie des patients, en altère considérablement la qualité. Les thérapeutiques disponibles à l'heure actuelle sont ciblées sur les facteurs d'amplification responsables de la prolifération et de l'inflammation psoriasique.

Le psoriasis, un désordre inflammatoire cutané, est caractérisé par une hyperprolifération accentuée des kératynocytes associée à une vascularisation significativement accrue de la peau, une activation des fibroblastes, une infiltration des fibroblastes, une infiltration de leucocytes, des modifications du métabolisme des eicosanoïdes et de la production des cytokines.

Sa définition repose sur des critères cliniques histologiques et évolutifs. Cliniquement, il est caractérisé par la présence de plaques érythémateuses bien limitées, recouvertes de squames épaisses blanchâtres. Le nombre et la localisation
5 des lésions sont variables. Le plus fréquemment, le psoriasis siège sur des régions exposées aux contacts extérieurs et symétriques (coude, genou). D'un point de vue histologique, les squames présentent un aspect hyperkératosique et parakératosique (persistance anormale des noyaux dans les couches
10 superficielles). Elles correspondent à un épaississement très important de l'épiderme avec une kératinisation anormale. Le derme est le siège d'une inflammation plus ou moins intense.

La peau est un organe en contact permanent avec d'une part l'extérieur, l'environnement, et d'autre part, avec les tissus
15 profonds de notre organisme. De ce fait, l'intégrité de cette structure cutanée joue un rôle primordial dans les communications cellules-cellules, et de là avec la différenciation des divers tissus. La peau est aussi un organe unique pouvant être reconstruit in vitro et représentant ainsi
20 un outil d'étude de la prolifération et différenciation cellulaire cutanée.

Au niveau de l'épiderme humain, il existe deux populations de kératinocytes : les cellules souches avec un haut potentiel de prolifération et les cellules avec un potentiel de
25 prolifération transitoire, qui sont responsables de la différenciation terminale du tissu. Durant leur évolution, de la couche basale jusqu'à la desquamation, les kératinocytes subissent de grands changements biochimiques et morphologiques. Les cellules des couches basale et suprabasale synthétisent des
30 cytokératines qui s'organisent en filaments et faisceaux de filaments (NELSON W. et al., 1983 : "The 50 and 58 Kda keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia : cell culture studies", J. Cell. Biol., 1997, 244-51) ; (EICHNER R. et al, 1996 : "The role of keratin subfamilies and keratin

pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments", J. Cell. Biol., 102, 1767-77). Les cellules de la couche granuleuse produisent d'autres protéines marqueurs de différenciation différentes des cytokératines K 1-K 10 telles
5 que involucrine, loricrine, transglutaminase impliquées dans la phase terminale de formation de la couche cornée (FUCHS E., 1990 : "Epidermal differentiation : the bare essentials", J. Cell. Biol, 111, 280714) où les cellules sont métaboliquement inactives.

10 Récemment, des études ont mis en évidence le rôle et la distribution des glycoprotéines desmosomiales (desmogléine) dans la morphogénèse épithéliale (ALLEN E. et al. : "Mice expressing a mutant desmosomal Cadherin Exhibit Abnormalities in Desmosomes, Proliferation and Epidermal differentiation",
15 J. Cell. Biol., 1996, 133(6), 1367-82). Ainsi, des modifications des desmosomes épidermiques chez la souris ont entraîné une augmentation de prolifération kératinocytaire et une hyperplasie épidermique. D'où la nécessité d'avoir une bonne distribution des desmosomes et des protéines desmosomiales telle la
20 desmogléine pour la constitution d'un épiderme normal. En outre, ces glycoprotéines sont en étroite relation avec les filaments intermédiaires donc, les kératines, éléments essentiels de l'architecture épidermique.

Les kératinocytes in vitro en culture sont incapables
25 d'assurer une différenciation terminale spontanée (ASSALINEAU D. et al., 1986 : "Human epidermis reconstructed by culture : is it normal?", J. Invest. Dermatol., 86, 181-85. Cependant, l'addition de certaines substances dans le milieu de culture, telles le calcium, les rétinoïdes, certains facteurs de
30 croissance, induit un programme de différenciation terminale dépendant de la substance appliquée (FUCHS E., 1990 : "Epidermal differentiation : the bare essentials", J. Cell. Biol, 111, 2807-14). La vitamine A et les rétinoïdes sont indéniablement des régulateurs physiologiques de la différenciation épidermique

terminale (DARMON M., 1991: "Retinoic acid in skin and epithelia", *Semiss. Dev. Biol.*, 2, 219-28) (WATT F., 1989 : "Terminal differentiation of epidermal keratinocytes", *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1, 1107-15). Un déficit ou un excès de
5 vitamine A induit des pathologies cutanées. D'autre part, les rétinoïdes sont utilisés par voie topique ou systémique dans le traitement de pathologies dermatologiques sévères. Cependant, l'épiderme répond différemment aux rétinoïdes selon que l'on s'adresse à un traitement in vivo ou in vitro en culture de
10 tissu.

Dans les essais in vitro, les rétinoïdes telle la vitamine A acide à concentration supra-physiologique 10^{-7} M induisent des modifications des cytokératines K1, K10 et des précurseurs des enveloppes cornées telle que l'involucrine.

15 Le psoriasis apparaît à tout âge, avec une évolution par poussées successives. Actuellement, en l'absence de traitement étiologique, le traitement local est indispensable et essentiel.

Les traitements locaux classiques comme les dermocorticoïdes, les goudrons, l'anthraline, les rétinoïdes,
20 présentent un grand nombre d'inconvénients et d'effets secondaires, et ne possèdent pas la double activité sur le versant inflammatoire et le versant prolifération.

Par exemple, les dermocorticoïdes sont responsables de
25 vergetures extensives, d'atrophies cutanées, de dépigmentation et d'effet iatrogène systémique classique, comme l'hypercorticisme.

La plante à la base de l'invention, le Myrte commun, *Myrtus communis* L., est un arbuste de la famille des Myrtaceae de 2 à
30 3 mètres de haut qui présente des feuilles opposées, coriaces, persistantes avec un pétiole court et un limbe ovalaire acuminé. Les fleurs blanches, longuement pédonculées, disposées à l'aisselle des feuilles, sont odorantes et comportent de nombreuses étamines. L'ovaire triloculaire est surmonté d'un

style à stigmate unique. Le fruit est une baie charnue ovoïde de la taille d'un pois, vert puis noir-bleuâtre à maturité. Il contient de très nombreuses graines jaunâtres dépourvues d'albumen. Toutes les parties de la plante contiennent des
5 poches schizogènes à huile essentielle qui sont responsables de la forte odeur aromatique après contusion.

Le Myrte jouit depuis l'Antiquité d'une renommée thérapeutique essentiellement basée sur la présence d'huile essentielle. Le nom latin *Myrtus* vient du grec *Myrtos* qui dérive
10 de *Myron* (parfum). Les anciens l'utilisaient comme antiseptique, désinfectant, parasiticide en usage externe et même interne, notamment comme stimulant et antibronchitique. L'eau distillée des feuilles et des fleurs a eu un certain succès sous le nom d' "Eau d'Ange" jusqu'au XIXe siècle comme aromatique et
15 astringent. Les feuilles ont été utilisées dans le traitement des plaies, des hémorroïdes et des affections pulmonaires. Autrefois, on expliquait ces effets bénéfiques par la présence de tanins et l'action antiseptique par l'activité de l'huile essentielle.

20 L'ouvrage de F.J. CAZIN "Traité Pratique et Raisonné des Plantes Médicinales Indigènes et Acclimatées" publié par Asselin & Houzeau à Paris en 1886 mentionne l'intérêt du "Myrte" dans le traitement du Psoriasis. "Cette plante, d'une odeur forte, aromatique, d'une saveur amère, passe pour tonique, excitante,
25 vermifuge et antipsorique". En fait , il s'agit de *Myrica gale* L., plante d'une famille (*Myricaceae*) différente du vrai Myrte (*Myrtaceae*), dont le nom vernaculaire est Myrte Batard. La partie de plante n'est nullement précisée, le caractère aromatique semble être important.

30 G. GARNIER et co-auteurs reprennent par erreur les informations de CAZIN pour le vrai Myrte (*Myrtus communis*) dans l'ouvrage "Ressources Médicinales de la Flore Française" édité par Vigot Frères à Paris en 1961. "L'huile essentielle, administrée autrefois sous le nom impropre de myrtol, douée de

propriétés antiseptiques et désinfectantes, agit comme stimulant de la digestion, est hémostatique et en plus exerce une action marquée sur les affections cutanées squameuses et principalement sur le psoriasis ; cependant, administrée à doses trop élevées, elle provoque chez l'homme des nausées, de la céphalée, de l'abattement...". Selon ces informations erronées à la base, il est clair que l'huile essentielle est responsable de l'activité antipsorique.

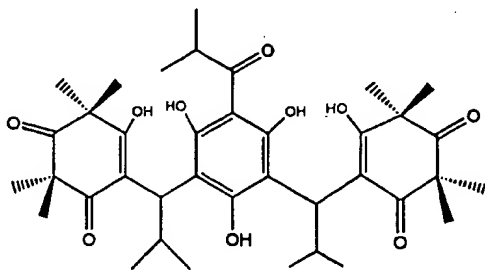
Le Myrte est cité dans de nombreux brevets:

- 10 - Le brevet FR 2 296 401 déposé le 31 décembre 1974 mentionne le Myrte mais celui-ci est inclu dans une une liste de 7 plantes et n'est pas présenté comme possédant une activité particulière. Les extraits de Myrte, Oignon, Hammamélis, Millepertuis, Algues, Levure plus de la progestérone du placenta glycérimé, du sulfate
- 15 neutre d'oxyquinoléine entrent dans une composition cosmétique revendiquée comme stimulante et fortifiante pour le cuir chevelu et la racine du cheveu.
- Le brevet FR 2 669 032 utilise les feuilles de Myrte parmi un choix de 16 plantes en vue d'extraire des dérivés du tocophérol.
- 20 - Le brevet FR 2 504 551 déposé le 24 avril 1981 revendique l'utilisation de préparations contenant des huiles essentielles de diverses Lamiaceae et d'autres familles botaniques dont les Myrtaceae pour traiter des affections cutanées telles que les brûlures, piqûres, gerçures ou coups.
- 25 - Le brevet EP-347 493 cite le Myrte parmi une liste de plus de 60 espèces végétales destinées à l'extraction de l'huile essentielle par un procédé particulier. Les propriétés thérapeutiques du Myrte ne sont nullement revendiquées.
- Le brevet FR 2 735 026 revendique une composition capillaire
- 30 comprenant un extrait de Myrte, son procédé de préparation et son utilisation notamment pour un traitement antipelliculaire. L'extrait mentionné est un extrait polaire enrichi en polyphénols, flavonoïdes et tanins.

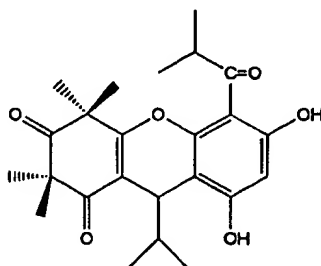
- L'association de cet extrait avec des antifongiques est revendiquée par les mêmes inventeurs dans le brevet FR 2 741 265.

Nous avons effectué l'étude phytochimique de cette plante et avons recherché l'extrait présentant la meilleure activité anti-inflammatoire et anti-prolifératrice sur le kératinocyte en culture. L'huile essentielle de Myrte obtenue par ces procédés classiques, citée depuis plusieurs siècles comme intéressante en thérapeutique, est selon nos travaux dépourvue d'intérêt antiinflammatoire et antiprolifératif.

L'extrait selon la présente invention qui présente des propriétés intéressantes notamment dans le traitement du psoriasis, est un extrait apolaire renfermant la famille des composés acylphloroglucinols dont les myrtucommulones et comprend aussi des triterpènes et stérols. Les myrtucommulones sont des structures complexes dérivant du phloroglucinol décrites en 1974 par Y. KASMAN et al., *Phytochemistry*, 30, 991-997. Les formules chimiques des myrtucommulones A et B sont présentées ci-dessous. Les fractions polaires riches en tanins ne sont pas intéressantes dans notre étude.



myrtucommulone-A



myrtucommulone-B

L'extrait selon la présente invention préparé à partir du Myrte, associe les avantages d'un anti-inflammatoire et d'un inhibiteur de prolifération des kératinocytes humains. L'une ou l'autre activité pharmacologique est nécessaire pour traiter efficacement le psoriasis comme nous l'avons vu dans la description de cette maladie.

En comparaison avec la vitamine A acide, molécule de référence dans le traitement du psoriasis, nous nous sommes donc proposés, dans un premier temps, de contrôler l'effet de l'extrait actif de Myrte (objet de notre invention) sur un modèle de culture de kératinocytes en milieu défini, afin d'obtenir une différenciation in vitro.

Plusieurs paramètres sont analysés:

15 - Analyse morphologique : contrôle de la viabilité de l'épiderme de culture : test de métabolisation du MTT [3, (4,5 diméthylthiazol) 2,5 diphenyltetrazolium bromide] en formazan par les cellules épidermiques basales et suprabasales vivantes, analyse histologique après coloration à l'Hemalum / Eosine /
20 Safran, évaluation de la couche cornée après traitement alcalin.

- Etude des marqueurs de prolifération et différenciation cellulaire : analyse du cycle cellulaire: immunomarquage Ki67, analyse de la différenciation: immunomarquage des cytokératines
25 K1, K10, analyse d'un précurseur de l'enveloppe cornée : immunomarquage de l'involucrine.

- Etude des marqueurs d'adhésion: marqueur d'adhésion cellule-cellule: immunomarquage de la desmoglérine 1-2.

30

L'étude comparative de la vitamine A acide 10^{-7} M, et de l'extrait actif de Myrte à diverses concentrations (0,3 ; 1 ; 3 et 5 $\mu\text{g/ml}$) nous permet de prédire l'effet de ce dernier sur l'organisation d'un épiderme en culture. Elle nous a donc permis

de suivre divers marqueurs de prolifération et de différenciation cellulaire sur un modèle d'épiderme de culture. Tout comme la vitamine A acide, l'extrait de Myrte est capable de réguler le comportement prolifératif (diminution du nombre de
5 cellules nucléées dans les couches basale et supra basale) et d'agir sur la formulation du stratum corneum en augmentant le nombre de strates. Il est capable de moduler négativement l'expression des marqueurs de différenciation K1-K10, ceci négativement.

10 Cependant, l'involucrine précurseur de l'enveloppe cornée et la desmogléïne constituant essentiel des cornéodesmosomes sont surexprimées avec l'extrait de Myrte, notamment à la concentration de 1 µg/ml. En agissant d'une part sur les protéines du cytosquelette cellulaire (kératines K1-K10) d'une
15 manière directe ou indirecte (au travers de l'expression de la desmogléïne) et d'autre part sur l'involucrine, précurseur essentiel de l'enveloppe des cornéocytes, l'extrait de Myrte pourrait être ainsi impliqué dans la régulation de l'expression de gènes intervenant dans la prolifération et différenciation
20 des cellules.

L'activité de l'extrait original de Myrte sur la régulation de la prolifération des kératinocytes est confirmée sur des cultures en monocouche.

25 L'étude est réalisée sur 48 heures de culture des kératinocytes humains en présence d'extrait actif de Myrte. La quantification de la population cellulaire est réalisée au Coulter Counter. L'extrait actif de Myrte présente une activité antiprolifératrice significative de 20 % à la concentration
30 5 µg/ml .

Par ailleurs, l'extrait de Myrte selon la présente invention a également une activité anti-inflammatoire, confirmée par une étude réalisée sur un modèle cellulaire de kératinocytes humains. Une réaction inflammatoire est créée in vitro par

l'addition de ionophore calcique A23187 : l'afflux de Ca^{++} intracellulaire déclenche la stimulation de la cascade de l'acide arachidonique et la synthèse des médiateurs inflammatoires, prostaglandines et leucotriènes. L'activité de l'extrait de Myrte est évaluée sur un des métabolites majeurs produits par le kératinocyte, la prostaglandine 6KF1 (PG 6KF1) qui est le métabolite stable de la prostacycline (PGI_2). La PG 6KF1 est mesurée par dosage immuno enzymatique (ELISA) dans les surnageants de culture. L'extrait actif de Myrte est évalué aux concentrations non cytotoxiques 0,1 $\mu g/ml$, 1 $\mu g/ml$ et 10 $\mu g/ml$. Cet extrait présente une activité inhibitrice significative et dose dépendante sur la production de PG6KF1 induite par A23187 :

- 12 % à la concentration 1 $\mu g/ml$ et
- 26 % à la concentration 10 $\mu g/ml$.

Cette étude démontre les propriétés anti-inflammatoires de notre extrait de Myrte.

L'extrait actif ainsi que les compositions dermatologiques et cosmétologiques en découlant, objets de la présente invention sont donc proposées dans le traitement des syndromes inflammatoires et prolifératifs cutanés et les troubles de la différenciation cutanée. D'autres indications thérapeutiques sont revendiquées comme par exemple les troubles de la kératinisation de la peau et du cuir chevelu, les parakératoses, la dermatite atopique, les xéroses, les diskératoses, les ichtyoses.

L'acné représente un désordre du follicule pilo-sébacée, particulièrement sensible au traitement par notre préparation à base de Myrte grâce à ses propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes sur *P. acnes*. L'extrait objet de cet invention est en effet actif sur *Staphylosoccus aureus* 6538P, *Corynebacterium xerosis* CIP 5216, *Streptosoccus mutans* ATCC 27351, *Propionibacterium acnes* ATCC 7919, *Candida albicans* ATCC

10232. La CMI, Concentration Minimale Inhibitrice sur ces différentes souches est de l'ordre de 10^{-6} . D'où un intérêt marqué dans le traitement de l'acné et de l'assainissement de la flore cutanée.

5

Préparation de l'extrait actif de Myrte :

Le procédé selon la présente invention permet d'accéder à l'extrait le plus approprié en vue de traiter le psoriasis.

10 L'extrait selon l'invention est une fraction encore inusitée du Myrte. Cet extrait est totalement différent de l'huile essentielle de Myrte utilisée depuis des millénaires et de l'extrait polaire du brevet Pierre FABRE Dermo-cosmétique FR 2735026. Ce brevet revendique la préparation d'un extrait
15 original de Myrte complètement différent du nôtre par sa polarité et par ses teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Notre extrait est titré en myrtocommulone B' (environ 6%) et comprend environ 40 % en masse de triterpènes et stérols par rapport à la masse de l'extrait de Myrte. Ces composés
20 apolaires sont absents des extraits polaires mais aussi de l'huile essentielle.

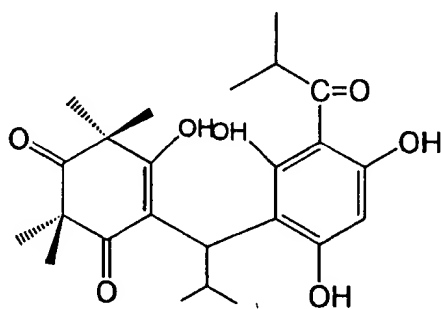
L'extrait selon la présente invention est rationnellement conçu pour agir sur les deux versants de la pathologie psoriasique (prolifération et inflammation). Les extraits
25 polaires ainsi que l'huile essentielle ont clairement démontré leur inactivité sur la prolifération kératinocytaire. L'indication psoriasis étant mentionnée par erreur dans GARNIER et de manière peu précise (cf référence CAZIN), l'utilisation de l'extrait selon l'invention dans le psoriasis n'est donc pas
30 décrite dans l'art antérieur.

Une grande simplicité concernant la mise en oeuvre industrielle caractérise le procédé selon l'invention. En effet notre méthode de préparation se distingue par l'absence d'une

étape obligatoire de séparation chromatographique et d'opération complexe.

Plusieurs mises en oeuvre du procédé selon l'invention peuvent être envisagées.

- 5 Selon une première variante de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les parties aériennes, en fruits ou non, sèches ou non, sont extraites par un solvant aqueux ou organique de préférence de l'éthanol. L'extrait obtenu est traité par une méthode appropriée avantageusement par du charbon actif, afin
- 10 d'éliminer les chlorophylles. Les composés apolaires de l'extrait "décoloré" sont isolés sélectivement soit par extraction liquide/liquide, soit avantageusement par précipitation en évaporant le solvant organique sur l'eau. Nous obtenons ainsi un extrait apolaire bien défini chimiquement que
- 15 nous titrons en Myrtucommulone B'. L'extraction initiale par l'éthanol permet d'obtenir un titre en Myrtucommulone B' au produit final compris entre 4% et 8%.



myrtucommulone-B'

Exemple 1

100 kg de parties aériennes broyées et sèches sont extraits à reflux pendant 1 heure par 500 litres d'éthanol (EtOH). Après
5 filtration à froid sur toile et rinçage de la drogue épuisée par 100 litres d'EtOH, 475 litres d'extrait éthanolique ont été séparés du marc. L'extrait est traité par 800 g de charbon actif, à reflux pendant 15 minutes puis filtré à chaud sur filtre AF-15 et rincé par 25 litres d'EtOH 96° chaud. L'addition
10 de 500 litres d'eau et l'évaporation de la totalité de l'EtOH entraîne la formation d'un précipité jaunâtre récupéré sur filtre AF-15. Ce précipité est lavé par 3 fois 30 litres d'eau. Après séchage sous vide pendant 72 heures à 30°C, broyage et tamassage nous obtenons 2,668 kg d'extrait actif de Myrte qui va
15 entrer dans les formes galéniques présentées plus bas. Cet extrait titre 6,6 % en myrtucommulone B', 7 % en acide ursolique. Les triterpènes et stérols représentent environ 40 % en masse par rapport à la masse d'extrait de Myrte.

20 L'utilisation d'autres alcools comme par exemple le méthanol (MeOH), l'isopropanol ou de cétones comme par exemple l'acétone ou la méthyléthylcétone pour réaliser l'extraction initiale permettent de préparer des extraits actifs de titres compris entre 2% et 12 % en Myrtucommulone B'.

25

Selon une deuxième variante de la mise en oeuvre du procédé, l'extrait actif de Myrte peut également être préparé par extraction à l'aide d'un solvant tel que l'hexane, le chlorure de méthylène, l'éther isopropylique, l'acétate d'éthyle... Ce
30 deuxième procédé n'est pas aussi avantageux que le premier car il fait intervenir des solvants autres que l'eau et l'éthanol. Il faudra donc rechercher les traces résiduelles de ces solvants organiques.

35

Exemple 2

1Kg de parties aériennes est extrait à deux reprises par 5 litres d'hexane. L'extrait obtenu (9,5 litres) est concentré jusqu'à 2 litres. Après addition de 5 litres d'éthanol, le filtrat est à nouveau concentré à 2,5 litres et ajusté à 5 litres par addition d'éthanol à 96°C. L'extrait est ensuite traité à reflux pendant 15 minutes par 8 g de charbon actif. Après addition de 5 litres d'eau et évaporation totale de l'éthanol, le précipité obtenu est filtré et séché sous vide à 30°C pendant 72 heures.

On obtient les mêmes résultats en utilisant l'acétate d'éthyle, l'éther isopropylique ou le dichlorométhane pour effectuer l'extraction initiale.

L'utilisation de ces solvants pour réaliser l'extraction initiale permet de préparer des extraits actifs de titres compris entre 2 et 12% en Myrtucommulone B' selon le solvant.

Les préparations galéniques qui suivent illustrent l'invention sans en limiter la portée.

Exemple 3 : Lotion

25

SD-alcool 39-C	63 ml
Parfum	0,20 g
Copolymère acétate de vinyle / Acide crotonique	0,15 g
PEG- 13 Octanoate	0,10 g
30 Chlorure de Laurylpyridinium	0,05g
Extrait de Myrte	0,1 à 1 g
Eau	qsp 100 ml

Exemple 4 : Crème

	PEG-40 Sorbitan lanolate	7,5 g
	Paraffine	5 g
5	Propylène glycol	5 g
	Alcool cétylique	3 g
	Polysorbate 20	3 g
	Lanoline	2 g
	Acide salicylique	1,5 g
10	Parfum	0,4 g
	Extrait de Myrte	0,1 à 3 g
	Eau	qsp 100 g

Exemple 5 : Huile

15	Adipate de dibutyle	15 g
	Triglycéride caprylique / caprique	10g
	Extrait de Myrte	0,1 à 5 g
	Huile minérale	qsp 100 g

20

Exemple 6 : Savon (Syndet)

	Cocoglisethionate de sodium	20 g
	Cire d'origine minérale	12 g
25	Alcool cétylique	13 g
	Amidon de blé	20 g
	Extrait de Myrte	0,1 à 5 g
	Hémisulfosuccinate de sodium	qsp 100 g

30 Exemple 7 : Mousse

	Gomme guar	0,10 g
	Huile de Jojoba	2 g
	P-méthoxy cinnamate d'éthyl-hexyl	1 g

	Vinyl pyrrolidone / DM-AE méthacrylate	1 g
	Copolymère PVP hexadécène	2 g
	Diméthyl / Triméthyl-Polysiloxane	1 g
	Bromure de cétrimonium	0,40 g
5	Parfum	0,15 g
	Extrait de Myrte	0,1 à 2 g
	Eau déminéralisée	qsp 100 g

Exemple 8 : Solution émolliente

10	Polysorbate 20	20 g
	Esters gras de coco polyéthoxyle	10 g
	Alkylphénol polyéthoxyle	10 g
	Parfum	1 g
15	Extrait de Myrte	0,1 à 10 g
	Propylène glycol	qsp 100 g

Exemple 9 : Huile gélifiée Corps

20	Triglycérade Caprilyque / caprique	20 à 30 g
	Huile minérale	36 g
	Pétrolatum	15 g
	PEG-40 sorbitol hexaoléate	8 g
	Quaternium- 18 Hectorite	5 g
25	Talloweth-60 hydrogéné Myristyl-Glycol	5 g
	Parfum	0,5 g
	Acide benzoïque	0,3 g
	Gallate de Propyle	0,02 g
	Extrait de Myrte	0,1 à 2 g

30

Exemple 10 : Shampoing

	Acide salicylique pulvérisé	1,50 g
	Dérivé Undécylénique	1 à 3 g

	Polymère Quaternaire	0,5 à 1 g
	Alkyl sulfate éthoxylé sodique	9 g
	Polysorbate 20	5 à 7 g
	Ethanolamide d'acides gras ou	
5	PEG 6000 distéarate	5 g
	Alkylamido bétaine	1,5 g
	Cocoamphodiacétate de sodium	3,5 g
	ETDA, 2Na	0,2 g
	Monolaurate sorbitan POE 20	5 g
10	Parfum	QS
	Colorant	QS
	Extrait de Myrte	0,1 à 2,5 g
	Eau purifiée	qsp 100 g
15	<u>Exemple 11</u> : Shampooin	
	Laureth sulfate de sodium	8 g
	Polysorbate 20	7 g
	PEG- 150 distéarate	4 g
20	Undécylénamido Mea-Sulfosuccinate de sodium	3 g
	Cocoamphodiacétate de sodium	3 g
	Acide salicylique	1,5 g
	Parfum	0,5 g
	Cocoyl-collagène hydrolysé de T.E.A.	1 g
25	Extrait de Myrte	0,1 à 1 g
	Eau	qsp 100 g

Exemple 12 : Spray

- 30 La lotion de l'exemple 3 peut être mise sous aérosol avec un hydrocarbure comme par exemple le butane ou le propane (50% lotion et 50% propulseur) ou par un système de pompe.

Il est clair que tous ces exemples seront réalisés selon les modes de préparation bien connus des hommes de l'art, et ne sauraient en aucun cas être exhaustifs.

REVENDICATIONS

1. Extrait de parties aériennes de Myrte caractérisé en ce que
5 cet extrait est une fraction apolaire contenant des composés
acylphloroglucinols et tel que cet extrait est essentiellement
exempt de chlorophylles.
2. Extrait selon la revendication 1 tel que parmi les composés
10 présents, on compte des myrtucommulones, des triterpènes et des
stérols, le titre de myrtucommulone B' étant compris entre 2% et
12 % et le titre du mélange "triterpènes et stérols" étant
compris entre 30 % et 50 %.
- 15 3. Extrait selon la revendication 2 tel que le titre de
myrtucommulone B' est compris entre 4% et 8%.
4. Extrait selon la revendication 2 ou 3 tel que le titre de
myrtucommulone B' est compris entre 5% et 7% et le titre du
20 mélange "triterpènes et stérols" est compris entre 37 % et 43 %.
5. Procédé de préparation d'un extrait de parties aériennes de
Myrte caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle
les parties aériennes de Myrte sont soumises à une extraction au
25 moyen d'un solvant, une étape d'élimination des chlorophylles et
une étape dans laquelle les composés apolaires sont isolés.
6. Procédé selon la revendication 5 tel que le solvant organique
utilisé pour effectuer une extraction sur les parties aériennes
30 de la plante est un alcool ou une cétone.

7. Procédé selon la revendiction 5 ou 6 tel que le solvant organique utilisé pour effectuer une extraction sur les parties aériennes de la plante est choisi dans le groupe formé par l'éthanol, le méthanol, l'isopropanol, l'acétone, la méthyléthylacétone, l'hexane, le chlorure de méthylène, l'éther isopropylique, l'acétate d'éthyle.
8. Procédé selon l'une des revendications 4 à 7, tel que l'élimination des chlorophylles est effectuée au moyen de charbon actif.
9. Procédé selon l'une des revendications 4 à 8, tel que les composés apolaires sont isolés par au moins un des procédés suivants, une extraction liquide/liquide, une précipitation en évaporant le solvant organique sur l'eau.
10. Extrait selon l'une des revendications 1 à 4, obtenu par le procédé selon l'une des revendications 5 à 9.
11. Composition dermatologique et/ou cosmétique telle qu'elle comprend un extrait selon l'une des revendications 1, 2, 3, 4, 10 ou un extrait obtenu par un procédé selon l'une des revendications 5 à 9.
12. Composition selon la revendication 11 pour le traitement du psoriasis.
13. Composition selon la revendication 11 pour le traitement des troubles de la kératinisation de la peau et du cuir chevelu, les parakératoses, la dermatite atopique, les xéroses, les diskératoses, les ichtyoses, l'acné.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/78 A61P17/06 A61P17/10 A61P17/12 A61P17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. ROTSTEIN ET AL.: "ISOLATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACYLPHLOROGLUCINOLS FROM MYRTUS COMMUNIS." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 6, no. 5, November 1974 (1974-11), pages 539-542, XP002105891 the whole document	1-7, 9-13
A	FR 2 741 265 A (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE) 23 May 1997 (1997-05-23) cited in the application	
A	FR 2 735 026 A (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE) 13 December 1996 (1996-12-13) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2000

Date of mailing of the international search report

16/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2741265 A	23-05-1997	EP 0866715 A WO 9718823 A	30-09-1998 29-05-1997
FR 2735026 A	13-12-1996	EP 0831865 A WO 9640180 A	01-04-1998 19-12-1996

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 99/02189

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/78 A61P17/06 A61P17/10 A61P17/12 A61P17/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	A. ROTSTEIN ET AL.: "ISOLATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACYLPHLOROGLUCINOLS FROM MYRTUS COMMUNIS." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 6, no. 5, novembre 1974 (1974-11), pages 539-542, XP002105891 le document en entier ---	1-7, 9-13
A	FR 2 741 265 A (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE) 23 mai 1997 (1997-05-23) cité dans la demande ---	
A	FR 2 735 026 A (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE) 13 décembre 1996 (1996-12-13) cité dans la demande -----	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">9 février 2000</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16/02/2000</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Rempp, G</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem . Internationale No
PCT/FR 99/02189

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2741265 A	23-05-1997	EP 0866715 A WO 9718823 A	30-09-1998 29-05-1997
FR 2735026 A	13-12-1996	EP 0831865 A WO 9640180 A	01-04-1998 19-12-1996